

称号及び氏名 博士（農学）望月知史

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 31 日

論文名 「植物茎頂組織のウイルス感染抑制機構に関する研究」

論文審査委員 主査 教授 大木 理

副査 教授 原田 二郎

副査 教授 石井 実

## 論文要旨

植物ウイルスは、農作物に感染するとモザイクや矮化など各種の病気を引き起こし、減収に至らしめる。植物のウイルス病については、薬剤防除が期待できないため、抵抗性品種や弱毒ウイルスによる防除が行われているが、栄養繁殖の作物では茎頂培養によるウイルスフリー化植物の作出とその最適栽培技術を組み合わせた耕種的防除法が基盤技術となっている。この茎頂培養は、ウイルスが感染できないと考えられている植物茎頂の生長点付近の組織を無菌的に培養し、ウイルスに感染していない個体を得る技術である。しかし、植物ウイルスが茎頂などの生長点付近で感染できない理由は、これまで明確に説明されていない。この理由を解明するには、茎頂組織におけるウイルス感染動態の解析に加え、植物の感染抑制機構の視点からの解析が必要である。近年、ウイルス感染植物のウイルス病徴からの回復あるいはモザイク葉緑色部のウイルス抵抗性が RNA サイレンシングによるものと考えられるようになったことから、茎頂組織におけるウイルス感染抑制機構への RNA サイレンシングの関与について検討する必要があると考えられた。

本研究は、茎頂組織におけるウイルス感染抑制機構の解明を目的とし、主と

してキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*: CMV) とその宿主であるタバコ (*Nicotiana tabacum*) を用いた。組織化学的手法によるウイルスの感染動態の観察により、茎頂組織における CMV 感染を決定するウイルス因子を明らかにし、さらに茎頂組織で発動する RNA サイレンシングとウイルスの感染動態について解析を加え、茎頂組織のウイルスフリー化機構について検討したものである。

## 1. タバコ茎頂組織における CMV の感染動態

タバコ茎頂組織における CMV の感染動態を明らかにするために、免疫組織化学法と *in situ hybridization* 法により、外被タンパク質 (CP) および CMV RNA の分布を経時的に観察した。Pepo-CMV を接種したタバコ茎頂組織では、CMV は接種 4 日後に茎頂下部の茎組織で検出され、7 日後には茎頂組織のほぼすべての細胞から検出された。しかし、CMV は 10、14 日後には茎頂組織から減少し、18、21 日後には茎頂および茎組織から検出されなくなった。Pepo-CMV が茎頂組織に感染を拡大する接種 6~8 日後の植物体計 60 個体の茎頂について詳細な観察をしたところ、CMV は 15 個体では生長点 (内体と外衣) から検出されなかったが、35 個体では内体の一部で、さらに 10 個体では外衣からも検出されたことから、pepo-CMV がタバコ生長点に感染できることが示された。

Pepo 以外の CMV 系統における生長点への感染の可否を調べるために、Zm-、MY17-、Y-、Cal-CMV の各系統について、接種 7、14、21 日後の茎頂組織における分布を免疫組織化学法により観察した。Zm-CMV は 7~21 日後まで生長点から高頻度で検出された。MY17-CMV は 7 日後には低頻度ながら生長点から検出されたが、10、14 日後には茎頂組織から分布が減少した。Y-CMV は 10、14 日後に茎頂組織で検出されたが、生長点からは検出されなかった。Cal-CMV は 7 日後に茎頂組織で検出されたが、生長点からは検出されず、さらに 10、14 日後には茎頂組

織から検出されなくなった。

以上の結果から、pepo<sup>-</sup>、Zm<sup>-</sup>、MY17-CMV はタバコの生長点に感染できることが証明された。しかし、生長点への感染は一時的で、ある期間を経過するとすべての系統の CMV 分布が茎頂組織から減少し、最終的にタバコ茎頂組織は CMV 感染から回復することが明らかになった。

## 2. 生長点への感染に関与する CMV 因子の決定

CMV の生長点への感染能が CMV 系統間で異なる原因を解明するため、pepo<sup>-</sup> と Y-CMV 間の各種ゲノム交換体を作製し、生長点への感染に関与する CMV のゲノム因子を探索した。タバコ生長点におけるゲノム交換体の分布を免疫組織化学法により観察した結果、RNA 2 と RNA 3 のいずれかが pepo 由来であれば生長点へ感染できること、さらに RNA 3 が pepo 由来であれば生長点へ効率的に感染できることが明らかになった。そこで、RNA 1、2 が Y-CMV 由来で RNA 3 が pepo<sup>-</sup> と Y-CMV 間の組換え体をもつ各種キメラウイルスと、CP の 129 番目のアミノ酸残基を置換した部位特異的突然変異ウイルス (Y129P) を用いて RNA 3 の因子についてさらに検討した結果、CP の 129 番目のアミノ酸残基がタバコ生長点への効率的な感染の決定因子であることが明らかになった。

CMV の生長点への感染が、細胞レベルでの増殖能力に依存するのか、あるいは組織における細胞間移行能力に依存するのかを明らかにするために、タバコ葉肉プロトプラストにおけるウイルス蓄積量とタバコ接種葉における分布について、pepo<sup>-</sup>、Y-CMV、上記のゲノム交換体および Y129P 間で、それぞれノーザンブロット法とティッシュブロット法により比較した。葉肉プロトプラストにおける蓄積量は供試ウイルス間で顕著な差は認められなかった。一方、接種 3 日後の接種葉では、RNA 3 が pepo 由来のゲノム交換体と Y129P は接種葉全域に分布が拡大していたが、RNA 3 が Y 由来のウイルスでは感染部位の拡大は認められなかった。

生長点を高頻度で感染する RNA 3 が pepo 由来のゲノム交換体と Y129P は接種葉での細胞間移行能が高かったことから、CMV の生長点への感染には細胞間移行能が重要であることが明らかになった。

### 3. タバコ茎頂組織におけるウイルス抑制機構

タバコ茎頂組織における CMV 感染からの回復機構への RNA サイレンシングの関与について検討するために、RNA サイレンシングが発動していると出現する 21~26 塩基の RNA、short interfering RNA (siRNA) を調査した。タバコにおける pepo-CMV と CMV RNA 由来の siRNA の検出量の変化をノーザブロット法により調べた結果、接種葉では siRNA が接種 4~21 日後まで検出されたことから、CMV 感染が RNA サイレンシングを誘起していることが確認された。茎頂組織では 7 日後から siRNA が検出され、CMV RNA が最大蓄積量を示す 10 日後には siRNA の検出量も増加した。CMV RNA が検出されなくなった 18~24 日後にも、siRNA が検出されたことから、茎頂組織の CMV 感染からの回復は RNA サイレンシングによるものと考えられた。

さらに、茎頂組織における RNA サイレンシングによる CMV 感染からの回復機構への CMV RNA 2 の影響について検討するために、ウイルス RNA の蓄積量の変化について、pepo-CMV と RNA 2 が Y 由来のゲノム交換体である P1Y2P3RNA の蓄積量は 14 日後には減少していたことから、RNA 2 がタバコ茎頂組織の CMV 感染からの回復の速さに関与していることが示された。

### 4. *Nicotiana benthamiana* 茎頂における各種植物ウイルスの感染動態

CMV で明らかになった、ウイルスの生長点への一時的な感染と茎頂組織のウイルス感染からの回復が、植物ウイルスに一般的な現象であるのかを検討した。宿主植物にはウイルスに対する感受性が高い *Nicotiana benthamiana* を用い、CMV、

*Tomato mosaic virus* (ToMV)、*Potato virus X* (PVX)、*Potato virus Y* (PVY) について、接種 7、10、14 日後の茎頂組織におけるウイルス分布を免疫組織化学法により観察した。CMV はタバコの場合と同様に、7 日後に茎頂組織全体から検出され、生長点にも認められたが、10、14 日後には茎頂組織から減少した。ToMV は、接種 7~14 日後に茎頂組織全体から検出され、さらに生長点にも分布が認められた。一方、PVX と PVY は単独感染では茎組織の維管束周囲にも分布が認められるのみで、感染は茎頂組織へは達していなかった。さらに、pepo-CMV と PVX もしくは PVY を *N. benthamiana* に混合接種してそれぞれの分布を観察したところ、PVX、PVY の分布は茎頂組織のほぼ全体に拡大したが、生長点では観察されなかった。

以上の結果から、ToMV は pepo-CMV 同様に *N. benthamiana* の生長点に感染できることが明らかになった。また、ToMV 感染した *N. benthamiana* 茎頂組織では、ウイルス感染からの回復は認められなかった。これらの結果から、これまで茎頂組織へは感染できないと考えられてきたウイルスも、ウイルスの属によっては感染可能であることが明らかになった。

以上の結果から、従来知見とは異なり、CMV などのウイルスが一時的には生長点に感染できることが明らかとなった。CMV の生長点への感染には RNA 2 と RNA 3 が関与し、生長点への効率的な感染には CP の 129 番目のアミノ酸残基が重要であり、これが細胞間移行能を介して働くものと考えられた。一方、ある期間を経過すると茎頂組織で RNA サイレンシングによるウイルス抑制が強く働き、CMV 感染から回復することが明らかとなった。以上の結果は、茎頂培養によるウイルスフリー株の効率的な生産のため、さらには植物ウイルスの感染発病機構、宿主植物のウイルス抵抗性機構の解明のために、重要な知見と考えられる。

## 審査結果の要旨

植物のウイルス病については、薬剤防除が期待できないため、抵抗性品種や弱毒ウイルスによる防除が行われているが、栄養繁殖の作物では茎頂培養によるウイルスフリー化植物の作出とその最適栽培技術を組み合わせた耕種的防除法が基盤技術となっている。この茎頂培養は、ウイルスが感染できないと考えられている植物茎頂の生長点付近の組織を無菌的に培養し、ウイルスに感染していない個体を得る技術である。しかし、植物ウイルスが茎頂などの生長点付近で感染できない理由は、これまで明確には説明されていない。本研究は、茎頂組織におけるウイルス感染抑制機構の解明を目的とし、主としてキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus* : CMV) とその宿主であるタバコ (*Nicotiana tabacum*) を用いた組織化学的手法によるウイルスの感染動態の観察により、茎頂組織における CMV 感染を決定するウイルス因子を明らかにした。さらに、茎頂組織で発動する RNA サイレンシングとウイルスの感染動態について解析を加え、茎頂組織のウイルスフリー化機構について検討したものである。

1. タバコ茎頂組織における CMV の感染動態を明らかにするために、免疫組織化学法と *in situ hybridization* 法により、外被タンパク質 (CP) と CMV RNA の分布を経時的に観察した。その結果、*pepo*<sup>-</sup>、*Zm*<sup>-</sup>、MY17-CMV はタバコの生長点に感染できることが証明された。しかし、生長点への感染は一時的で、ある期間を経過するとすべての系統の CMV 分布が茎頂組織から減少し、最終的にタバコ茎頂組織は CMV 感染から回復することが明らかになった。
2. CMV の生長点への感染能が CMV 系統間で異なる原因を解明するため、*pepo*<sup>-</sup> と Y-CMV 間の各種ゲノム交換体を作製し、生長点への感染に関与する CMV のゲノム因子を探索したところ、RNA 2 と RNA 3 のいずれかが *pepo* 由来で

あれば生長点へ感染できること、さらに RNA 3 が pepo 由来であれば生長点へ効率的に感染できることが明らかになった。そこで、各種キメラウイルスと CP の 129 番目のアミノ酸残基を置換した部位特異的突然変異ウイルス (Y129P) を用いて RNA 3 の因子についてさらに検討した結果、CP の 129 番目のアミノ酸残基がタバコ生長点への効率的な感染の決定因子であることが明らかになった。また、生長点に高頻度で感染するウイルスは接種葉での細胞間移行能が高かったことから、これが CMV の生長点への感染に重要であることが明らかになった。

3. タバコ茎頂組織における CMV 感染からの回復機構への RNA サイレンシングの関与について検討するために、pepo-CMV と CMV RNA 由来の short interfering RNA (siRNA) の検出量の変化をノーザンブロット法により調べた。その結果、茎頂組織では 7 日後から siRNA が検出され、CMV RNA が最大蓄積量を示す 10 日後に siRNA の検出量も増加したことから、CMV 感染が RNA サイレンシングを誘起していることが確認された。また、CMV RNA が検出されなくなった 18~24 日後にも siRNA が検出されたことから、茎頂組織の CMV 感染からの回復は RNA サイレンシングによるものと考えられた。さらに、pepo-CMV とゲノム交換体間で分布を比較した結果、RNA 2 がタバコ茎頂組織の CMV 感染からの回復の速さに関与していることが示された。
4. これらが植物ウイルスに一般的な現象であるのかどうかについて、CMV、*Tomato mosaic virus* (ToMV)、*Potato virus X*、*Potato virus Y* と共通宿主である *N. benthamiana* を用いて調査した。その結果、ToMV は *N. benthamiana* の生長点で検出され、これまで感染できないと考えられてきたウイルスも茎頂組織に感染可能であることが明らかになった。

以上の結果から、従来の知見とは異なり、**CMV** などのウイルスが一時的には生長点に感染できることが明らかとなった。**CMV** の生長点への感染には **RNA 2** と **RNA 3** が関与し、生長点への効率的な感染には **CP** の 129 番目のアミノ酸残基が重要であり、これが細胞間移行能を介して働くものと考えられた。一方、ある期間を経過すると茎頂組織では **RNA** サイレンシングによるウイルス抑制が強く働き、**CMV** 感染から回復することが明らかとなった。これらの知見は、植物病理学ならびに応用植物科学の発展に大きく寄与するものと考えられる。よって、最終試験の結果とあわせて、博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。